O tolueno é um solvente orgânico muito utilizado no meio ocupacional, o que torna sua exposição bastante difundida, principalmente entre pintores. Os danos causados por tal exposição podem alterar o status antioxidante sanguíneo, via aumento de espécies reativas. Para tanto, foi validado um método por cromatografia líquida para quantificação da vitamina C sérica, um antioxidante exógeno. Curvas analíticas em solução aquosa e com adição de padrão foram efetuadas para verificar linearidade e precisão. O método foi aplicado em 30 pintores expostos a tintas automobilísticas e 10 indivíduos não-expostos. Foram quantificadas as concentrações de vitamina C e malondialdeído (MDA). A monitorização biológica foi realizada através das concentrações urinárias de ácido hipúrico (HA). As curvas com adição de padrão e aquosa (n = 5) apresentaram coeficientes de regressão superiores a 0,99 e de variação inter e intradia inferiores a 15%. Em relação ao estresse oxidativo, os níveis de MDA e HA estavam significativamente aumentados nos indivíduos expostos (p < 0.05) em relação ao controle. Foi observada correlação positiva entre HA e MDA (r = 0.42; p < 0.05) e correlações negativas entre vitamina C versus HA e MDA (r = -0.34; p < 0.05 e r = -0.39; p < 0.05) respectivamente. Além disso, as concentrações de vitamina C estavam diminuídas nos expostos comparados aos controles (p < 0.05). O método demonstrou ser linear, reprodutível e aplicável, oferecendo uma alternativa simples e confiável para quantificação de vitamina C por CLAE. Assim, mesmo com um baixo nível de exposição ao tolueno, houve aumento da peroxidação lipídica e aparente depleção do antioxidante exógeno, vitamina C.